

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

29. 7. 2004

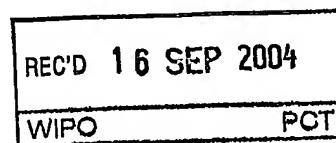
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 7月29日

出願番号
Application Number: 特願2003-202863
[ST. 10/C]: [JP2003-202863]

出願人
Applicant(s): 永井 良三
眞鍋 一郎
協和醸酵工業株式会社



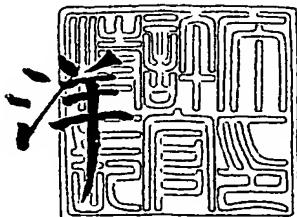
BEST AVAILABLE COPY

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 9月 2日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願
【整理番号】 H15-1104S3
【提出日】 平成15年 7月29日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 15/00
C12Q 1/68
A61K 31/7105
A61K 31/713
A61K 48/00
A61P 9/10
A61P 35/00

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区本郷 2-32-2-1204
【氏名】 永井 良三

【発明者】

【住所又は居所】 東京都台東区池之端 4-15-8-202
【氏名】 真鍋 一郎

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県駿東郡長泉町下土狩 1188 協和醸酵工業株式
会社 医薬総合研究所内
【氏名】 石原 淳

【特許出願人】

【識別番号】 594053419
【氏名又は名称】 永井 良三

【特許出願人】

【住所又は居所】 東京都台東区池之端 4-15-8-202
【氏名又は名称】 真鍋 一郎

【特許出願人】

【識別番号】 000001029
【氏名又は名称】 協和醸酵工業株式会社
【代表者】 松田 謙

【代理人】

【識別番号】 100106574

【弁理士】

【氏名又は名称】 岩橋 和幸

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008187
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 KLF5遺伝子の発現を抑制するRNA

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の(a)～(c)からなる群から選ばれるKLF5遺伝子の発現を抑制するRNA。

(a) 配列番号2～16のいずれか1つの配列および該配列と相補的な配列のそれぞれの3'端に2～4個のウリジル酸またはデオキシチミジル酸を付加した配列からなる二本鎖RNA。

(b) 配列番号2～16のいずれか1つの配列および該配列と相補的な配列を2個のウリジル酸またはデオキシチミジル酸を5'端に有するスペーサー配列でつなぎ、3'端に2～4個のウリジル酸またはデオキシ体チミジル酸を付加した配列からなるヘアピン構造を形成するRNA。

(c) 配列番号2～16のいずれか1つの配列および該配列と相補的な配列のそれぞれの3'端に2個のウリジル酸を付加した配列からなる二本鎖RNA。

【請求項 2】 請求項1に記載のRNAを発現するベクター。

【請求項 3】 請求項1に記載のRNAまたは請求項2に記載のベクターを細胞に導入することにより、該細胞中のKLF5遺伝子の発現を抑制する方法。

【請求項 4】 請求項1に記載のRNAまたは請求項2に記載のベクターを細胞に導入することにより、該細胞中のKLF5により転写が活性化される遺伝子の発現を抑制する方法。

【請求項 5】 KLF5により転写が活性化される遺伝子が血小板由来増殖因子A鎖遺伝子または平滑筋ミオシン重鎖SMemb遺伝子である請求項4に記載の方法。

【請求項 6】 請求項1に記載のRNAまたは請求項2に記載のベクターを有効成分として含有する、KLF5遺伝子またはKLF5により転写が活性化される遺伝子の発現を抑制するための医薬組成物。

【請求項 7】 請求項1に記載のRNAまたは請求項2に記載のベクターを有効成分として含有する、心血管系疾患もしくは癌の治療薬または予防薬。

【請求項 8】 心血管系疾患が動脈硬化、冠動脈インターベンション後の再狭窄または心肥大である請求項7に記載の治療薬または予防薬。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明が属する技術分野】**

本発明は、KLF5遺伝子の発現を抑制するRNAに関する。

【0002】**【従来の技術】**

クルッペル様因子 (Kruppel-like factor、以下KLFと略す) ファミリーは、C末端のジンク・フィンガー (zinc finger) モチーフを特徴とする、転写因子のファミリーであり、KLF1、KLF2、KLF3、KLF4、KLF5、KLF6、KLF7、KLF8、KLF9、KLF10、KLF11、KLF12、KLF13、KLF14、KLF15、KLF16等が知られている。哺乳類において、KLFファミリーは、様々な組織や細胞、例えば赤血球、血管内皮細胞、平滑筋、皮膚、リンパ球等の分化に重要であること、また癌、心血管疾患、肝硬変、腎疾患、免疫疾患等の各種疾患の病態形成に重要な役割を果たしていることが報告されている（非特許文献1および2参照）。

【0003】

KLFファミリーのうちのKLF5は、BTEB2 (basic transcriptional element binding protein 2) あるいはIKLF (intestinal-enriched Kruppel-like factor) ともよばれる。血管平滑筋におけるKLF5の発現は、発生段階で制御を受けており、胎児の血管平滑筋では、高い発現を示すのに対し、正常な成人の血管平滑筋では発現が見られなくなる。また、バルーンカテーテルによる削剥後に新生した血管内膜の平滑筋では、KLF5の高い発現がみられ、動脈硬化や再狭窄の病変部の平滑筋でもKLF5の発現がみられる（非特許文献3参照）。

【0004】

動脈硬化巣や経皮的冠動脈形成術後の再狭窄部位などの病変部位の血管平滑筋は、活性化しており、筋フィラメントの消失、蛋白合成の亢進、増殖能や遊走能を示し、胎児の血管平滑筋と同様の形質（胎児型）へ形質転換している。平滑筋細胞にはSM1、SM2、SMembという3種類のミオシン重鎖のアイソフォームが存在するが、胎児型への形質転換に伴い、SM2が消失し、SMembの発現誘導が認められる。KLF5は、SMemb遺伝子の転写制御配列と結合し、その転写を活性化する（非

特許文献4参照）。さらに、血小板由来増殖因子A鎖（以下PDGF-Aとよぶ）、トランスフォーミング増殖因子（TGF）- β 、血管内皮増殖因子（VEGF）リセプター、誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）、プラスミノーゲンアクチベーターインヒビター（PAI）-1および転写因子Egr（early growth response）-1など、血管の形質や血管新生に関与する遺伝子の転写を活性化することが報告されている（非特許文献5および6参照）。

【0005】

また、KLF5遺伝子のヘテロノックアウトマウスにおいて、心血管系への物理的負荷やアンジオテンシンIIにより引き起こされる血管平滑筋増殖と血管内膜肥厚、血管新生、血管外膜の肉芽形成、心肥大および心筋線維化等が著明に抑制されていることが報告されている（非特許文献5参照）。

このように、KLF5遺伝子は平滑筋形質変換に関わるだけでなく、広く心血管系の病態形成に関わる転写因子であり、その機能発現には遺伝子発現量がきわめて重要である。KLF5は、動脈硬化や、心肥大等の心血管系の疾患あるいは癌等の血管新生が関与する疾患の病態形成に関与するので、KLF5遺伝子の発現を抑制することでこれらの疾患の治療または予防に有用な薬剤となりうることが予想される。しかし、現在のところKLFファミリー遺伝子の発現を効果的に抑制する薬剤は知られていない。

【0006】

一方、RNA干渉（RNA interference、以下、RNAiとよぶ）は、線虫において標的とする遺伝子と同一の配列を有する二本鎖RNAを導入することにより、標的遺伝子の発現が特異的に抑制される現象として報告された（非特許文献7参照）。

RNAiは、導入した二本鎖RNAが、21～23塩基の長さの二本鎖RNAに分解された後、蛋白質複合体がこの短い二本鎖RNAと結合し、同じ配列を有するmRNAを認識し切斷することによって起こると考えられている。Tuschlらは、ショウジョウバエにおいて長い二本鎖RNAの代わりに、21～23塩基の長さの二本鎖RNAを導入することによっても、標的遺伝子の発現が抑制されることを見いだし、これをshort interfering RNA（siRNA）と名づけた（特許文献1参照）。siRNAの配列と標的遺伝子とのミスマッチがあると非常に発現抑制の効果が弱まること、長さは21塩基が

最も効果が高く、平滑末端よりも、両方の鎖の3'末端にヌクレオチドが付加して、末端が突出した構造の方が効果が高いことが示された（特許文献2参照）。

【0007】

哺乳類細胞では、長い二本鎖RNAを導入した場合、ウイルス防御機構により遺伝子全体の発現抑制とアポトーシスが起こり、特定の遺伝子の抑制をすることができなかつたが、20~29塩基のsiRNAであれば、このような反応がおこらず、特定の遺伝子の発現を抑制をすることができる見いだされた。なかでも21~25塩基のものが発現抑制効果が高い（非特許文献8、9、10および11参照）。

【0008】

RNAiでは、二本鎖RNAは一本鎖アンチセンスRNAに比べ、標的遺伝子に対する発現抑制効果が飛躍的に高いことが報告されている（非特許文献7および12参照）。また、二本鎖RNAでなく、分子内ハイブリダイズにより、ヘアピン構造を形成する一本鎖RNAも、siRNAと同様にRNAiを示すことが報告されている（非特許文献13参照）。

【0009】

RNAiはin vitroのみならず、in vivo試験においても多く検証されており、50bp以下のsiRNAを用いた胎児の動物での効果（特許文献3参照）、成体マウスでの効果（特許文献4参照）が報告されている。また、siRNAをマウス胎児に静脈内投与した場合に、腎臓、脾臓、肺、脾臓、肝臓の各臓器で発現抑制効果が確認されている（非特許文献14参照）。さらに、脳細胞においてもsiRNAを直接投与することで作用することが報告されている。（非特許文献15参照）しかし、これまでのところKLF5あるいは他のKLFファミリー遺伝子に対するsiRNAを用いたRNAiに関しては報告例がない。

【0010】

【特許文献1】

国際公開第01/75164号パンフレット

【0011】

【特許文献2】

国際公開第02/44321号パンフレット

【0012】

【特許文献3】

国際公開第02/132788号パンフレット

【0013】

【特許文献4】

国際公開第03/10180号パンフレット

【0014】

【非特許文献1】

ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry) , (米国) , 2001年, 第276巻, 第37号, p. 3
4355-34358

【0015】

【非特許文献2】

ジェノム・バイオロジー (Genome Biology) , (イギリス) , 2003年, 第4巻, 第2号, p. 206

【0016】

【非特許文献3】

サーキュレーション (Circulation) , (米国) , 2000年, 第102巻, 第20号, p. 2528-2534

【0017】

【非特許文献4】

サーキュレーション・リサーチ (Circulation Research) , (米国) , 1999年, 第85巻, 第2号, p. 182-191

【0018】

【非特許文献5】

ネイチャー・メディシン (Nature Medicine) , (米国) , 2002年, 第8巻, 第8号, p. 856-863

【0019】

【非特許文献6】

アナルズ・オブ・ザ・ニュー・ヨーク・アカデミー・オブ・サイエンシズ (Annals of the New York Academy of Sciences) , (米国) , 2001年, 947卷, p. 56-66

【0020】

【非特許文献7】

ネイチャー (Nature) , (イギリス) , 1998年, 第391卷, 第6669号, p. 806-811

【0021】

【非特許文献8】

ネイチャー (Nature) , (イギリス) , 2001年, 第411卷, 第6836号, p. 494-498

【0022】

【非特許文献9】

ネイチャー・レビューズ・ジェネティクス (Nature Reviews Genetics) , (イギリス) , 2002年, 第3卷, 第10号, p. 737-747

【0023】

【非特許文献10】

モレキュラー・セル (Molecular Cell) , (米国) , 2002年, 第10卷, 第3号, p. 549-561

【0024】

【非特許文献11】

ネイチャー・バイオテクノロジー (Nature Biotechnology) , (米国) , 2002年, 第20卷, 第5号, p. 497-500

【0025】

【非特許文献12】

モレキュラー・セル (Molecular Cell) , (米国) , 2002年, 第10卷, 第3号, p. 537-548

【0026】

【非特許文献13】

プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユニテッド・ステーツ・オブ・アメリカ (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) , (米国) , 2002年, 第99巻, 第9号, p. 6047-6052

【0027】**【非特許文献14】**

ネイチャー・ジェネティクス (Nature Genetics) , (米国) , 2002年, 第32巻, 第1号, p. 107-108

【0028】**【非特許文献15】**

ネイチャー・バイオテクノロジー (Nature Biotechnology) , (米国) , 2002年, 第20巻, 第10号, p. 1006-1010

【0029】**【発明が解決しようとする課題】**

本発明の目的はKLF5遺伝子の発現を抑制するRNAを見出すことである。このようなRNAは、KLF5遺伝子の発現を抑制することにより、KLF5の転写因子としての機能を阻害し、心血管性疾患や癌等のKLF5が病態の形成に関与する疾患に対する、副作用の少ない治療薬または予防薬に用いることができる。

【0030】**【課題を解決するための手段】**

本発明者らは、銳意検討を行った結果、以下に記載する発明を完成するに至った。すなわち、本発明は以下の（1）～（8）に関する。

（1）以下の(a)～(c)からなる群から選ばれるKLF5遺伝子の発現を抑制するRNA。

（a）配列番号2～16のいずれか1つの配列および該配列と相補的な配列のそれぞれの3'端に2～4個のウリジル酸またはデオキシチミジル酸を付加した配列からなる二本鎖RNA。

（b）配列番号2～16のいずれか1つの配列および該配列と相補的な配列を2個

のウリジル酸またはデオキシチミジル酸を5'端に有するスペーサー配列でつなぎ、3'端に2～4個のウリジル酸またはデオキシ体チミジル酸を付加した配列からなるヘアピン構造を形成するRNA。

(c) 配列番号2～16のいずれか1つの配列および該配列と相補的な配列のそれぞれの3'端に2個のウリジル酸を付加した配列からなる二本鎖RNA。

(2) (1)に記載のRNAを発現するベクター。

(3) (1)に記載のRNAまたは(2)に記載のベクターを細胞に導入することにより、該細胞中のKLF5遺伝子の発現を抑制する方法。

(4) (1)に記載のRNAまたは(2)に記載のベクターを細胞に導入することにより、該細胞中のKLF5により転写が活性化される遺伝子の発現を抑制する方法。

。

【0031】

(5) KLF5により転写が活性化される遺伝子が血小板由来増殖因子A鎖遺伝子または平滑筋ミオシン重鎖SMemb遺伝子である(4)に記載の方法。

(6) (1)に記載のRNAまたは(2)に記載のベクターを有効成分として含有する、KLF5遺伝子またはKLF5により転写が活性化される遺伝子の発現を抑制するための医薬組成物。

(7) (1)に記載のRNAまたは(2)に記載のベクターを有効成分として含有する、心血管系疾患もしくは癌の治療薬または予防薬。

(8) 心血管系疾患が動脈硬化、冠動脈インターベンション後の再狭窄または心肥大である(7)に記載の治療薬または予防薬。

【0032】

【発明の実施の形態】

1. KLF5遺伝子の発現を抑制するRNA

KLF5遺伝子の発現を抑制するRNAは、KLF5 cDNAの配列から設計した配列を有するRNAをいくつか調製し、KLF5遺伝子が発現している細胞に調製したRNAを導入してKLF5遺伝子の発現を測定し、KLF5遺伝子の発現を抑制するRNAを選択することにより、取得できる。

【0033】

(1) 二本鎖RNAの配列の設計

遺伝子の発現を抑制したい動物のKLF5 cDNAの塩基配列から、AAではじまる21塩基の部分配列を取り出す。取り出した配列のGC含量を計算し、GC含量が20～80%、好ましくは30%～70%、より好ましくは40～60%の配列を複数個選択する。配列は、好ましくは、コード領域内の配列で、開始コドンから75塩基以上下流の配列を選択する。KLF5 cDNAの塩基配列の情報は、GenBank等の塩基配列データベースから得ることができる。例えば、マウスKLF5 cDNAの配列はGenBank登録番号NM_009769（配列番号49）、ヒトKLF5 cDNAの配列はGenBank登録番号AF287272（配列番号50）で、配列情報が得られる。

【0034】

選択した配列の5'末端のAAを除き、配列中のTをUにえた19塩基の配列およびこの19塩基の配列と相補的な配列それぞれの3'端に2個のUまたはdT（デオキシ体のチミジル酸）を付加した配列を、調製するRNAの配列とする

【0035】

(2) 二本鎖RNAの調製

(1) で設計した配列を有するRNAは、化学合成あるいはインビトロ転写により調製できる。化学合成は、DNA合成機を用いて行うことができる。またアンビオン（Ambion）社、日本バイオサービス株式会社、キアゲン（QIAGEN）社等のメーカーに化学合成を依頼することもできる。化学合成した互いに相補的な配列を含む2本のRNAをアニーリングすることにより、二本鎖RNAを調製する。アニーリングは、2本のRNAを適当なバッファー中で90～95℃で1～5分加熱後、45～60分間かけて室温にまで冷却することにより行うことができる。

【0036】

インビトロ転写によるRNAの調製は、以下のようにして行うことができる。まず、(a) T7 RNAポリメラーゼのプロモーター配列を有するDNA(T7プライマー)、および(b) (1)で設計したRNAの配列と相補的な配列のUをTに変え、その3'端にT7プライマーの3'端8塩基と相補的な配列を付加した配列を有するDNAをそれぞれ調製する。T7プライマーと(b)のDNAとをアニールさせた後、DNAポリメラーゼ反応により、二本鎖DNAにする。得られた二本鎖DNAを錠型として、T7 RNA

ポリメラーゼを用いたインビトロ転写反応を行うことにより、設計した配列を有するRNAを合成することができる。互いに相補的な配列を含む2本のRNAをそれぞれ合成する反応を行った後、2つの反応液を混ぜて、さらにインビトロ転写反応を続けることにより、合成された2本のRNAをアニーリングした後、デオキシリボヌクレアーゼおよび一本鎖RNA特異的なりボヌクレアーゼにより、鑄型の二本鎖DNAおよび二本鎖を形成しない各RNA鎖の5'側の余分な配列を分解して除去する。以上の反応は、サイレンサーSiRNA作製キット（Silencer·siRNA Construction Kit、アンビオン社製）等のキットを用いて行うことができる。T7プライマーとアニールさせるDNAは、DNA合成機により化学合成することができる。またアンビオン社、日本バイオサービス株式会社、北海道システムサイエンス株式会社、キアゲン社等のメーカーに化学合成を依頼することもできる。

【0037】

（3）KLF5遺伝子の発現抑制

KLF5遺伝子を発現する細胞株に（2）で調製した二本鎖RNAを導入する。細胞株は、（1）のRNAの配列の設計のもとにしたKLF5 cDNAと同じ動物種の細胞を用いる。KLF5遺伝子を発現する細胞株としては、平滑筋や纖維芽細胞に由来する細胞株、例えばマウス胎児纖維芽細胞株C3H/10T1/2（ATCC番号：CCL-226）をあげることができる。二本鎖RNAの導入は、動物細胞へのトランスフェクション用試薬、例えばポリフェクト（Polyfect）トランスフェクション試薬（キアゲン社製）、トランスメッセンジャー（TransMessenger）トランスフェクション試薬、オリゴフェクトアミン（Oligofectamine）試薬（インビトロジェン社製）、リポフェクトアミン（Lipofectamine）2000（インビトロジェン社製）等を利用して、これらの試薬と二本鎖RNAを混合して複合体を形成させた後、細胞に添加することにより行うことができる。

【0038】

二本鎖RNAを導入した細胞のKLF5遺伝子の発現は、RT-PCRにより解析することができる。二本鎖RNAを導入した細胞および導入しなかった細胞から総RNAを調製し、このRNAからcDNAを合成する。合成したcDNAを鑄型にして、KLF5遺伝子に特異的なプライマーを用いたPCRを行い、KLF5 cDNAに由来する増幅産物の量を、ア

ガロースゲル電気泳動によって定量することにより、KLF5遺伝子の発現量を測定することができる。二本鎖RNAを導入しなかった細胞のKLF5遺伝子の発現量と比較して、KLF5遺伝子の発現量が減少した細胞に導入した二本鎖RNAを、KLF5遺伝子の発現を抑制するRNAとして選択する。

【0039】

このようにして選択された、KLF5遺伝子の発現を抑制するRNAとしては、配列番号2～11のいずれか1つの配列および該配列と相補的な配列のそれぞれの3'端に2個のUを付加した配列からなる二本鎖RNAをあげることができる。

【0040】

(4) KLF5遺伝子の発現を抑制するRNA

(3) で選択された二本鎖RNA以外にも、以下のようなRNAが本発明の本発明のKLF5遺伝子の発現を抑制するRNAに含まれる。これらのRNAも、(2)に記載の化学合成やインビトロ転写により調製することができる。

【0041】

(3) で選択された二本鎖RNAの配列の3'端の2ヌクレオチドを、2～4個のUまたはdTに変えた二本鎖RNAも、本発明のKLF5遺伝子の発現を抑制するRNAに含まれる。

(1) のRNAの配列の設計のもとにしたKLF5 cDNAの動物種とは異なる動物種のKLF5 cDNAにおいて、上記で選択された二本鎖RNAの配列と対応する配列からなる二本鎖RNAは、その異なる動物種のKLF5遺伝子を抑制するので、本発明のKLF5遺伝子の発現を抑制するRNAに含まれる。例えば、マウスKLF5 cDNAの配列から設計された、配列番号2～4、7～11のいずれか1つの配列および該配列と相補的な配列のそれぞれの3'端に2～4個のUまたはdTを付加した配列からなる二本鎖RNAは、マウスKLF5遺伝子の発現を抑制するが、ヒトKLF5 cDNAの配列でこれらの配列に相当する配列である配列番号12、13、4、14、8、15、10および16のいずれか1つの配列および該配列と相補的な配列のそれぞれの3'端に2～4個のUまたはdTを付加した配列からなる二本鎖RNAは、ヒトKLF5遺伝子の発現を抑制する本発明のRNAである。配列番号4、8、10のいずれか1つの配列および該配列と相補的な配列のそれぞれの3'端に2～4個のUまたはdTを付加した配列からなる二本鎖RNAは

、ヒトとマウスの両方のKLF5遺伝子の発現を抑制する。

【0042】

また、選択された二本鎖RNAの配列の3'端の2ヌクレオチドを除いた互いに相補的な2つの配列を、2個のUまたはdTを5'端に有するスペーサー配列でつなぎ、3'端に2～4個のUまたはdTを付加した配列からなるヘアピン構造を形成するRNAも、細胞内で切断を受けて二本鎖RNAに変換され、KLF5遺伝子の発現を抑制するので、本発明のKLF5遺伝子の発現を抑制するRNAに含まれる。スペーサー配列は、6～12塩基の長さが好ましく、2個のUまたはdTを5'端に有していれば任意の配列でよい。スペーサー配列の例としては、UUCAAGAGAをあげることができる。スペーサー配列によってつながれる互いに相補的な2つの配列は、どちらが先でもよい。このようなRNAとして、配列番号2～16のいずれか1つの配列および該配列と相補的な配列を2個のウリジル酸またはデオキシチミジル酸を5'端に有するスペーサー配列でつなぎ、3'端に2～4個のウリジル酸またはデオキシ体チミジル酸を付加した配列からなるヘアピン構造を形成するRNAをあげることができる。

【0043】

2. KLF5遺伝子の発現を抑制するRNAを発現するベクター

(1) プラスミドベクター

KLF5遺伝子の発現を抑制するRNAを発現するプラスミドベクターを、培養細胞または生体内の細胞に導入することにより、細胞内で該RNAが産生され、導入した細胞でのKLF5遺伝子の発現を抑制することができる。該ベクターは、U6プロモーターあるいはH1プロモーター等RNAポリメラーゼIIIのプロモーターを含む動物細胞用プラスミドベクター（以下、siRNA発現用ベクターとよぶ）のプロモーターの下流に、1. で選択された二本鎖RNAの配列の3'端の2個のヌクレオチドを除いた互いに相補的な2つの配列（UはTに変換する）を、2個のTを5'端に有するスペーサー配列でつなぎ、3'端にRNAポリメラーゼIIIターミネーターとなる4～6個のTからなる配列を含むDNA（以下、KLF5 siRNA用DNAとよぶ）を挿入して作製することができる。スペーサー配列としては、2個のTを5'端に有する6～12塩基の配列が好ましく、例えば、TTCAAGAGAをあげることができる。スペーサー

配列でつなぐ互いに相補的な2つの配列の順序は、どちらが先でもよい。siRNA発現用ベクターとしては、pSilencer 1.0-U6（アンビオン社製）、pSilencer 3.0（アンビオン社製）、pSUPER [オリゴエンジン (OligoEngine) 社製]、pSIREN-DNR [BDバイオサイエンシズ・クロンテック (BD Biosciences Clontech) 社製] 等をあげることができる。

【0044】

上記のKLF5 siRNA用DNAを挿入して作製した組換えベクターを導入した細胞では、U6プロモーターからのRNAポリメラーゼIII反応により、1. (4) に記載したヘアピン構造を形成するRNAが合成され、このRNAが細胞内で切断を受けてKLF5遺伝子の発現を抑制する二本鎖RNA (siRNA) に変換される。組換えベクターの細胞への導入は、通常の動物細胞へのベクターの導入と同様に、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等により行うことができる。

【0045】

(2) ウイルスベクター

siRNA発現ベクターとして、レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター等のウイルスベクターを利用したsiRNA発現用ベクターを用いることもできる。このようなウイルスベクターを利用したsiRNA発現用ベクターとして、pSUPER. retro (オリゴエンジン社製)、pSIREN-RetroQ (BDバイオサイエンシズ・クロンテック社製)、文献 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100, 1844 (2003); Nat. Genet., 33, 401 (2003)] に記載のベクターなどをあげることができる。

【0046】

ウイルスベクターを利用したsiRNA発現用ベクターに上記と同様のKLF5 siRNA用DNAを挿入して作製した組換えベクターを、用いたウイルスベクターに応じたパッケージング細胞に導入することにより、該組換えベクターを含む組換えウイルスを生産させる。組換えベクターのパッケージング細胞への導入は、上記と同様に、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等により行うことができる。得られた組換えウイルスを細胞に接触させて感染させることにより、組換えベクタ

ーが細胞に導入され、1. (4) に記載したヘアピン構造を形成するRNAが合成され、このRNAが細胞内で切断を受けてKLF5遺伝子の発現を抑制するsiRNAに変換される。

【0047】

3. KLF5遺伝子の発現を抑制するRNAの利用法

(1) KLF5により転写が活性化される遺伝子の発現の抑制

KLF5は転写因子として、種々の遺伝子の発現を活性化している。KLF5遺伝子の発現を抑制するRNAにより、KLF5遺伝子の発現が抑制される結果、KLF5により転写が活性化される遺伝子の発現も抑制することができる。KLF5により転写が活性化される遺伝子としては、SMemb、PDGF-A、TGF- β 、VEGFリセプター、PAI-1、Egr-1等の遺伝子をあげることができる。

【0048】

(2) KLF5の機能の解析

KLF5遺伝子の発現を抑制するRNAを、種々の細胞に作用させ、その細胞の形質の変化や、各種遺伝子の発現量の変動を調べることにより、それぞれの細胞におけるKLF5の機能を解析することができる。また、該RNAは、胎児から成体まで、さまざまな発育段階の動物でKLF5遺伝子の発現抑制をすることができるので、ヘテロノックアウトマウスの解析だけではわからないKLF5の機能の解明をすることが可能となる。

【0049】

4. 本発明のRNAまたはベクターを有効成分として含有する医薬組成物

本発明のKLF5遺伝子の発現を特異的に抑制するRNA、または該RNAを発現するベクターを投与することにより、KLF5および、KLF5が転写を活性化する遺伝子の発現が抑制され、平滑筋の増殖や血管新生が阻害されるので、動脈硬化、冠動脈インターベンション後の再狭窄や心肥大等の心血管系の疾患あるいは癌の治療または予防をすることができる。

【0050】

本発明のRNAまたは該RNAを発現するベクターは、医薬品として使用する場合、単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される添加剤（例

えば担体、賦形剤、希釈剤等)、安定化剤または製薬上必要な成分と混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。また、ウイルスベクターの場合は、組換えウイルスの形態でウイルスベクターを投与することが望ましい。

【0051】

投与経路は、治療に際し最も効果的なものを使用するのが望ましく、口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内などの非経口投与または経口投与をあげることができ、望ましくは静脈内投与、筋肉内投与をあげることができる。静脈内投与、筋肉内投与に適当な製剤としては、注射剤があげられる。

本発明のRNAまたは該RNAを発現するベクターを、注射剤の形態に成形するに際しては、担体として、たとえば、水、エチルアルコール、マクロゴール、プロピレングリコール、クエン酸、酢酸、リン酸、乳酸、乳酸ナトリウム、硫酸および水酸化ナトリウム等の希釈剤、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウムおよびリン酸ナトリウム等のpH調整剤および緩衝剤、ピロ亜硫酸ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸、チオグリコール酸およびチオ乳酸等の安定化剤等が使用できる。なお、この場合等張性の溶液を調製するに十分な量の食塩、ブドウ糖、マンニトールまたはグリセリンを医薬製剤中に含有せしめてもよい。安定化剤としては、グルコース等の単糖類、サッカロース、マルトース等の二糖類、マンニトール、ソルビトール等の糖アルコール、塩化ナトリウム等の中性塩、グリシン等のアミノ酸、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体(ブルロニック)、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル(トウイーン)等の非イオン系界面活性剤、ヒトアルブミン等が例示される。また、細胞内への取り込みを促進するため、本発明のRNAまたは該RNAを発現するベクターを、該RNAまたはベクターを含むリポソームとして調製して用いてもよい。

【0052】

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

【0053】

【実施例】

実施例1 siRNAによるKLF5遺伝子の発現抑制

(1) siRNAの調製

KLF5遺伝子の発現を抑制できるsiRNAの配列として、マウスKLF5 cDNAの配列（GenBank登録番号：NM_009769、配列番号49）から、（a）AAではじまる21塩基の配列、（b）GC含量が20～80%の2つの条件に当てはまる、11個の部分配列を選択した。ただし、開始コドン（配列番号49の167～169番目の配列）より75塩基以上下流の、コード領域（配列番号167～1507番目の配列）内の配列で、GC含量が40～60%のものとなるべく選択するようにした。選択した配列の配列番号49における配列の位置、GC含量を第1表に示した。選択した配列の5'端のAAを除いた19塩基の配列のTをUに変えた配列をそれぞれ配列番号1～11に示した。

【0054】

【表1】

第1表

選択した配列	配列の位置	GC含量	作製したRNAの配列	配列番号	siRNA番号
AACATGAACGTCTCCTCCCT	537-556	48% (10/21)	CAUGAACGUUUCCUCCCUTT	17	No. 1
			AGGGAGGAAGACGUUCAUGTT	18	
AAATTTACCTGCCACTCTGCC	1156-1176	48% (10/21)	AUUUACCUUGCCACUCUGCCUU	19	No. 2
			GGCAGAGUGGCAGGUAAUUU	20	
AAGGAGTAACCCGGATCTGGA	1216-1236	52% (11/21)	GGAGUAACCCGGGAUCUGGAUU	21	No. 3
			UCCAGAUCCGGGUUACUCUUU	22	
AAAAGCTCACCTGAGGACTCA	1303-1323	48% (10/21)	AAGCUCACCUGAGGACUCAUU	23	No. 4
			UGAGUCCUCAGGUGAGCUUUU	24	
AATCCCCAGACCGTCCATGCC	151-171	62% (13/21)	UCCCCAGACCGGUCCAUGCCUU	25	No. 5
			GGCAUGGACGGUCUGGGGUU	26	
AACGCTGCGCCCACCCGCCTG	1515-1535	76% (16/21)	CGCUGCGCCCACCCGCCUGUU	27	No. 6
			CAGGCAGGGUGGGCGCAGCGUU	28	
AAATGGAGAAGTATCTGACCC	405-425	43% (9/21)	AUGGAGAAGUAUCUGACCCUU	29	No. 7
			GGGUCAGAUACUUUCUCCAUUU	30	
AAAGTATAGACGAGACAGTGC	463-483	43% (9/21)	AGUAUAGACGAGACAGUGCUU	31	No. 8
			GCACUGUCUCGUCAUACUUU	32	
AAACCAGACGGCAGTAATGGA	874-894	48% (10/21)	ACCAGACGGCAGUAUUGGAUU	33	No. 9
			UCCAUUACUGCCGUCUGGUUU	34	
AAGCTCAGAGCCTGGAAGTCC	2048-2068	57% (12/21)	GCUCAGAGCCUGGAAGGUUU	35	No. 10
			GGACUUCCAGGCUCUGAGCUU	36	
AAGCCGTTCCAGTGCATGGTG	1424-1444	57% (12/21)	GCCGUUCCAGUGCAUGGUGUU	37	No. 11
			CACCAUGCACUGGAACGGCUU	38	

配列番号1～11のいずれかの配列および該配列と相補的な配列の3'端にそれぞれ2個のUまたはdTを附加した配列からなる11種類の二本鎖RNA（以下、それぞれsiRNA No. 1～No. 11とよぶ）を以下のようにして調製した。siRNA No. 1～No. 11それぞれのセンス鎖およびアンチセンス鎖の配列を第1表に示した（配列番号17～38）。siRNA No. 1は、配列番号17および18の配列からなる2本のRNAを、株式会社日本バイオサービスに依頼して化学合成し、アニーリングさせることによ

り調製した。siRNA No. 2～No. 11はサイレンサーsiRNA作製キット (SilencerTM siRNA Construction Kit、アンビオン社製) を利用したインビトロ転写により調製した。インビトロ転写の錆型作製に用いるDNAは、北海道システム・サイエンス株式会社に化学合成を依頼した。また、文献 [Nat. Genet., 32, 107-108, 2002; 米国特許出願公開 第2002/0132788号明細書] に基づき、配列番号39および40の配列からなる、分泌型アルカリフェオスマターゼ (SEAP) 遺伝子の発現を抑制するsiRNA (以下、SEAP-siRNAとよぶ) を、サイレンサーsiRNA作製キットを利用したインビトロ転写により調製し、コントロールのsiRNAとして用いた。

【0055】

(2) siRNAによるKLF5遺伝子の発現抑制

マウス胎児線維芽細胞株C3H/10T1/2 (入手先：アメリカン・タイプ・カルチャーレ・コレクション (ATCC) 、ATCC番号：CCL-226) をウェルあたり 4×10^5 個になるよう6ウェル・プレート (コーニング社製) に播種した。1.5 μg のsiRNA No. 2、No. 3、No. 4、No. 5、No. 6およびSEAP-siRNAそれぞれに、細胞内導入試薬ポリフェクト (polyfectR、キアゲン社製) 10 μL を添加して混合し、室温下5～10分保持した後、各ウェルに添加した。5% CO_2 存在下37 $^{\circ}\text{C}$ で48時間から72時間インキュベーションし、細胞にそれぞれのsiRNAを導入した。

【0056】

siRNAによるKLF5遺伝子の発現抑制は、以下に示すRT-PCRにより確認した。インキュベーション終了後、回収した細胞から、細胞溶解液ホモジエナイス用キットのQIAシュレッダー (QIAshredder、キアゲン社製) および総RNA精製用キットのRNイージー (RNeasy、キアゲン社製) を用いてRNAを単離した。単離したRNAを、30～50 μL の注射用水 (大塚蒸留水、大塚製薬株式会社製) で溶解し、逆転写反応によりcDNAを合成した。逆転写反応は、5×緩衝液2.5 μL 、0.1mol/L ジチオスレイトール (DTT) 2.0 μL 、20mmol/L dNTP (ロッシュ社製) 1.0 μL 、50 $\mu\text{mol/L}$ ランダムプライマー (宝酒造株式会社製) 2.0 μL 、ヌクレアーゼ阻害剤スーパーーゼ・イン (SUPERase·In、アンビオン社製) 1.0 μL 、パワースクリプト (PowerScript) 逆転写酵素 (クロントック社製) 1.0 μL およびRNA溶液1.0 μg を混合し、合計18 μL になるよう注射用水を加えた反応溶液で、42 $^{\circ}\text{C}$ で1.5時間実施した

。5×緩衝液およびDTTはパワースクリプト逆転写酵素に付属のものを用いた。

【0057】

それぞれ配列番号41および42の配列からなる2本のDNAを化学合成し、それマウスKLF5遺伝子特異的なフォワードプライマー、リバースプライマーとした。これらのプライマーを用いたPCRにより、KLF5 cDNAから配列番号49の1268～1428番目の配列に相当する161bpの断片が増幅される。

10×PCR緩衝液2.5μL、2.5mmol/L dNTP（ロッシュ製）2.0μL、5μmol/L フォワードプライマー2.0μL、5μmol/Lリバースプライマー2.0μL、ホットスター タック（HotStarTaq）DNAポリメラーゼ（キヤゲン社製、5単位/μL）0.125μL、18S rRNA特異的プライマー〔クォンタムmRNA（QuantumRNA）クラシック18S内部標準、アンビオン社製〕2μL、注射用水13.375μL、cDNA 1.0μLからなる25 μLのPCR反応溶液を調製し、95℃で15分保持後、熱変性94℃で30秒間、アニーリング53℃で30秒間、伸長反応72℃で40秒間の反応を1サイクルとして、28サイクルのPCRを実施し、その後72℃で10分間保持した。10×PCR 緩衝液はホットスター タックDNAポリメラーゼに付属のものを使用した。反応後の溶液の0.8%アガロースゲル電気泳動により、KLF5 mRNAに由来する増幅産物(161bp)を検出し、siRNAを導入しなかった細胞での増幅産物の量と比較した。内部標準として、18S rRNAに由来する増幅産物(488bp)を用いた。図1に示すように、コントロールのSEAP-siRNAではKLF5遺伝子の発現の抑制が見られないのに対し、KLF5遺伝子に特異的な、siRNA No. 2、No. 3、No. 4、No. 5およびNo. 6は、KLF5遺伝子の発現を抑制することが確認できた。中でも、siRNA No. 3およびsiRNA No. 4は強くKLF5遺伝子の発現を抑制した。

【0058】

KLF5遺伝子に特異的なsiRNAとして、siRNA No. 1、No. 4、No. 7、No. 8、No. 9、No. 10およびNo. 11を用いて、上記と同様にして、C3H/10T1/2細胞へのsiRNAの導入と、RT-PCRによるKLF5遺伝子の発現の解析を行った。図2に示すように、コントロールのSEAP-siRNAではKLF5遺伝子の発現の抑制が見られないのに対し、KLF5遺伝子に特異的な、siRNA No. 4、No. 7、No. 8、No. 9、No. 10およびNo. 11は、KLF5遺伝子の発現を抑制することが確認できた。中でも、siRNA No. 4

、 siRNA No. 7、 siRNA No. 9およびsiRNA No. 10は強くKLF5遺伝子の発現を抑制した。KLF5遺伝子に特異的であるにもかかわらず、 siRNA No. 1では抑制がみられなかった。

【0059】

実施例2 KLF5遺伝子特異的なsiRNAによる、 KLF5により転写が活性化される遺伝子の発現の抑制

(1) PDGF-A遺伝子の発現の抑制

KLF5遺伝子に特異的なsiRNAとして、 siRNA No. 1、 No. 4、 No. 7、 No. 8、 No. 9、 No. 10およびNo. 11をC3H/10T1/2細胞へ導入し、 RT-PCRにより、 KLF5により転写が活性化される遺伝子であるPDGF-A遺伝子の発現の解析を行った。

【0060】

実施例1 (2) と同様にして、 siRNAのC3H/10T1/2細胞への導入、 cDNAの調製を行った。配列番号43および44の配列からなる2本のDNAを化学合成し、 それぞれPDGF-A遺伝子特異的なフォワードプライマーおよびリバースプライマーとした。これらのプライマーを用いたPCRにより、 PDGF-A cDNAから403bpの断片が増幅される。PDGF-A遺伝子特異的なフォワードプライマーおよびリバースプライマーを、 KLF5遺伝子特異的なフォワードプライマーおよびリバースプライマーの代わりに用いて、 実施例1 (2) のKLF5遺伝子の発現解析と同様にして、 PDGF-A遺伝子の発現を解析した。ただしPCRは、 PCR反応溶液を95℃で15分間保持後、 热変性94℃で30秒間、 アニーリング53℃で30秒間、 伸長反応72℃で40秒間からなる反応を1サイクルとし、 26サイクル実施し、 その後72℃/10分保持する条件で行い、 電気泳動は1%アガロースゲルで行った。

【0061】

図3に示すように、 コントロールのSEAP-siRNAではPDGF-A遺伝子の発現の抑制が見られないのに対し、 KLF5遺伝子に特異的な、 siRNA No. 4、 No. 7、 No. 8、 No. 9、 No. 10およびNo. 11は、 KLF5により転写が活性化される遺伝子であるPDGF-A遺伝子の発現をも抑制することが確認できた。中でも、 siRNA No. 4、 siRNA No. 7、 siRNA No. 9およびsiRNA No. 10は強くPDGF-A遺伝子の発現を抑制した。KLF5遺伝子に特異的であるにもかかわらず、 siRNA No. 1では抑制がみられなかっ

た。

【0062】

(2) SMemb遺伝子の発現の抑制

KLF5遺伝子に特異的なsiRNAとして、siRNA No. 1、No. 4、No. 7、No. 8、No. 9、No. 10およびNo. 11をC3H/10T1/2細胞へ導入し、RT-PCRにより、KLF5により転写が活性化される遺伝子であるSMemb遺伝子の発現の解析を行った。

【0063】

実施例1(2)と同様にして、siRNAのC3H/10T1/2細胞への導入、cDNAの調製を行った。配列番号45および46の配列からなる2本のDNAを化学合成し、それぞれSMemb遺伝子特異的なフォワードプライマーおよびリバースプライマーとした。これらのプライマーを用いたPCRにより、SMemb cDNAから235bpの断片が増幅される。SMemb遺伝子特異的なフォワードプライマーおよびリバースプライマーを、KLF5遺伝子特異的なフォワードプライマーおよびリバースプライマーの代わりに用いて、実施例1(2)のKLF5遺伝子の発現解析と同様にして、SMemb遺伝子の発現を解析した。ただしPCRは、PCR反応溶液を95℃で15分間保持後、熱変性94℃で30秒間、アニーリング53℃で30秒間、伸長反応72℃で40秒間からなる反応を1サイクルとし、26サイクル実施し、その後72℃/10分保持する条件で行い、電気泳動は1%アガロースゲルで行った。

【0064】

図4に示すように、コントロールのSEAP-siRNAではSMemb遺伝子の発現の抑制が見られないのに対し、KLF5遺伝子に特異的な、siRNA No. 4、No. 7、No. 8、No. 9、No. 10およびNo. 11は、KLF5により転写が活性化される遺伝子であるSMemb遺伝子の発現をも抑制することが確認できた。中でも、siRNA No. 4、siRNA No. 7、siRNA No. 9およびsiRNA No. 10は強くSMemb遺伝子の発現を抑制した。KLF5遺伝子に特異的であるにもかかわらず、siRNA No. 1では抑制がみられなかった。

【0065】

(3) KLF5遺伝子特異的なsiRNAによる遺伝子発現の抑制の特異性

KLF5遺伝子に特異的なsiRNAによる遺伝子の発現の抑制が、KLF5遺伝子およびK

KLF5により転写が活性化される遺伝子に特異的であることを、KLF5遺伝子に特異的なsiRNAをC3H/10T1/2細胞へ導入し、RT-PCRにより血清応答因子（SRF）遺伝子の発現を解析することにより、検証した。SRF遺伝子は平滑筋細胞で多く発現する転写因子の遺伝子であり、KLF5により転写が活性化される遺伝子でない。

【0066】

KLF5遺伝子に特異的なsiRNAとして、siRNA No. 1、No. 4、No. 7、No. 9およびNo. 10を用いて、実施例1（2）と同様にして、siRNAのC3H/10T1/2細胞への導入、cDNAの調製を行った。配列番号47および48の配列からなる2本のDNAを化学合成し、それぞれSRF遺伝子特異的なフォワードプライマーおよびリバースプライマーとした。これらのプライマーを用いたPCRにより、SRF cDNAから519bpの断片が増幅される。SRF遺伝子特異的なフォワードプライマーおよびリバースプライマーを、KLF5遺伝子特異的なフォワードプライマーおよびリバースプライマーの代わりに用いて、実施例1（2）のKLF5遺伝子の発現解析と同様にして、SRF遺伝子の発現を解析した。ただしPCRは、PCR反応溶液を95℃で15分間保持後、熱変性94℃で30秒間、アニーリング53℃で30秒間、伸長反応72℃で40秒間からなる反応を1サイクルとし、26サイクル実施し、その後72℃/10分保持する条件で行い、電気泳動は1.2%アガロースゲルで行った。

【0067】

図5に示すように、KLF5遺伝子に特異的な、siRNA No. 1、siRNA No. 4、No. 7、No. 9およびNo. 10全てにおいて、コントロールのSEAP-siRNAと同様に、SRF遺伝子の発現の抑制がみられなかった。したがって、KLF5遺伝子に特異的なsiRNAは、非特異的に、遺伝子全体の発現を抑制するのではなく、KLF5遺伝子およびKLF5により転写の活性化をうける遺伝子の発現を特異的に抑制することが明らかとなった。

【0068】

【発明の効果】

本発明のRNAにより、KLF5遺伝子およびKLF5により転写が活性化される遺伝子の発現を抑制することができる。本発明のRNAまたは該RNAを発現するベクターの投与により、KLF5遺伝子およびKLF5により転写が活性化される遺伝子の発現が抑

制され、平滑筋の増殖や血管新生を抑制できるので、本発明のRNAまたは該RNAを発現するベクターは、動脈硬化、冠動脈インターベンション後の再狭窄、心肥大等の心血管系疾患、あるいは癌の治療剤または予防剤の有効成分として使用することができる。

【0069】

「配列表フリーテキスト」

配列番号1-発明者：永井良三；眞鍋一郎；石原淳

配列番号17-siRNA No. 1 センス鎖

配列番号18-siRNA No. 1 アンチセンス鎖

配列番号19-siRNA No. 2 センス鎖

配列番号20-siRNA No. 2 アンチセンス鎖

配列番号21-siRNA No. 3 センス鎖

配列番号22-siRNA No. 3 アンチセンス鎖

配列番号23-siRNA No. 4 センス鎖

配列番号24-siRNA No. 4 アンチセンス鎖

配列番号25-siRNA No. 5 センス鎖

配列番号26-siRNA No. 5 アンチセンス鎖

配列番号27-siRNA No. 6 センス鎖

配列番号28-siRNA No. 6 アンチセンス鎖

配列番号29-siRNA No. 7 センス鎖

配列番号30-siRNA No. 7 アンチセンス鎖

配列番号31-siRNA No. 8 センス鎖

配列番号32-siRNA No. 8 アンチセンス鎖

配列番号33-siRNA No. 9 センス鎖

配列番号34-siRNA No. 9 アンチセンス鎖

配列番号35-siRNA No. 10 センス鎖

配列番号36-siRNA No. 10 アンチセンス鎖

配列番号37-siRNA No. 11 センス鎖

配列番号38-siRNA No. 12 アンチセンス鎖

配列番号39-siRNA-SEAP センス鎖

配列番号40-siRNA-SEAP アンチセンス鎖

配列番号41-KLF5遺伝子特異的フォワードプライマー

配列番号42-KLF5遺伝子特異的リバースプライマー

配列番号43-PDGF-A遺伝子特異的フォワードプライマー

配列番号44-PDGF-A遺伝子特異的リバースプライマー

配列番号45-SMemb遺伝子特異的フォワードプライマー

配列番号46-SMemb遺伝子特異的リバースプライマー

配列番号47-SRF遺伝子特異的フォワードプライマー

配列番号48-SRF遺伝子特異的リバースプライマー

【0070】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.

<120> RNAs which inhibit KLF5 gene expression

<130> H15-1104S3

<160> 50

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 19

<212> RNA

<213> *Mus musculus*

<220>

<223> Inventor: Nagai, Ryozo; Ishihara, Atsushi; Manabe, Ichiro

<400> 1

caugaacguc uuuccuccu

19

<210> 2

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 2

auuuuaccugc cacucugcc

19

<210> 3

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 3

ggaguaaccc ggaucugga

19

<210> 4

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 4

aagcucaccu gaggacuca

19

<210> 5

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 5

uccccagacc guccaugcc

19

<210> 6

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 6

cgcugcgcac acccgccug

19

<210> 7

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 7

auggagaagu aucugaccc

19

<210> 8

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 8

aguauagacg agacagugc

19

<210> 9

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 9

accagacggc aguaaugga

19

<210> 10

<211> 19

<212> RNA

<213> Mus musculus

<400> 10

gcucagagcc uggaagucc

19

<210> 11

<211> 19

<212> RNA

<213> *Mus musculus*

<400> 11

gccguuccag ugcauggug

19

<210> 12

<211> 19

<212> RNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 12

auuuuacccac caccugcc

19

<210> 13

<211> 19

<212> RNA

<213> *Homo sapiens*

<400> 13

ggaguaaccc cgauuugga

19

<210> 14

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

auggagaagu aucugacac 19

<210> 15

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

aucagacagc agcaaugga 19

<210> 16

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

gcccuuccag ugcggggug 19

<210> 17

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA No. 1 sense strand

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> DNA

<400> 17

caugaacguc uuuccuccut t

21

<210> 18

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA No. 1 antisense strand

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(21)

<223> DNA

<400> 18

agggaggaag acguucaugt t

21

<210> 19

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA No. 2 sense strand

<400> 19

auuuaccugc cacucugccu u

21

<210> 20

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA No. 2 antisense strand

<400> 20

ggcagagugg cagguaaauu u

21

<210> 21

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA No. 3 sense strand

<400> 21

ggaguaaccc ggaucuggau u

21

<210> 22

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA No. 3 antisense strand

<400> 22

uccagauccg gguuacuccu u

21

<210> 23

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA No. 4 sense strand

<400> 23

aagcucaccu gaggacuau u

21

<210> 24

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA No. 4 antisense strand

<400> 24

ugaguccuca ggugagcuuu u

21

<210> 25

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA No. 5 sense strand

<400> 25

uccccagacc guccaugccu u

21

<210> 26

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA No. 5 antisense strand

<400> 26

ggcauggacg gucuggggg u

21

<210> 27

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA No. 6 sense strand

<400> 27

cgcugcgccc acccgccugu u

21

<210> 28

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA No. 6 antisense strand

<400> 28

caggcgggug ggcgcagcgu u

21

<210> 29

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA No. 7 sense strand

<400> 29

auggagaagu aucugacccu u

21

<210> 30

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA No. 7 antisense strand

<400> 30

gggucagaua cuucuccauu u

21

<210> 31

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA No. 8 sense strand

<400> 31

aguauagacg agacagugcu u

21

<210> 32

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA No. 8 antisense strand

<400> 32

gcacugucuc gucuauacuu u

21

<210> 33

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA No. 9 sense strand

<400> 33

accagacggc aguaauggau u

21

<210> 34

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA No. 9 antisense strand

<400> 34

uccauuacug ccgucuggcu u

21

<210> 35

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA No. 10 sense strand

<400> 35

gcucagagcc uggaaguccu u

21

<210> 36

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA No. 10 antisense strand

<400> 36

ggacuuccag gcucugagcu u

21

<210> 37

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA No. 11 sense strand

<400> 37

gccguuccag ugcauggugu u

21

<210> 38

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA No. 11 antisense strand

<400> 38

caccaugcac uggaacggcu u

21

<210> 39

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> SEAP-siRNA sense strand

<400> 39

aggcaacuu ccagaccauu u

21

<210> 40

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> SEAP-siRNA antisense strand

<400> 40

auggucugga aguugccuu u

21

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> KLF5 gene specific forward primer

<400> 41

ggttgcacaa aagtttatac

20

<210> 42

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> KLF5 gene specific riverse primer

<400> 42

ggcttggcgc ccgtgtgctt cc

22

<210> 43

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PDGF-A gene specific forward primer

<400> 43

ctccagcgac tcttggagat ag 22

<210> 44

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PDGF-A gene specific reverse primer

<400> 44

ttcagggtgg aggtcgacaca tg 22

<210> 45

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> SMemb gene specific forward primer

<400> 45

aatgccccgcc agcagctgga gcgac

25

<210> 46

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> SMemb gene specific riverse primer

<400> 46

gctcccttata ctgatccgca tgccg

25

<210> 47

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> SRF gene specific forward primer

<400> 47

tggcaccagt gtctgctact gtcag

25

<210> 48

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> SRF gene specific reverse primer

<400> 48

gctgccctat cacagccatc tggtg

25

<210> 49

<211> 1591

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (167)..(1507)

<223>

<400> 49

ccgagcccaag gagcccccgt ctccgtgcc gccttcgtga gcgtctggct gccggcccaag

60

gggtcccccg ccgcggccccc ccgcccggatc cgccgtcccg tgccagcccg agcgaggtgg

120

gatcgatc gctccgtgtc ccgtcccgat aatccccaga ccgtcc atg ccc acg	175		
Met Pro Thr			
1			
cggtgtcc accatg agccgc ctggat ggc cca ctgc ccc cag ccg ccg	223		
Arg Val Leu Thr Met Ser Ala Arg Leu Gly Pro Leu Pro Gln Pro Pro			
5	10	15	
gccgacccggccggatccgttgcgcctgc aagccgtgtccggc	271		
Ala Ala Gln Ala Glu Pro Val Phe Ala Gln Leu Lys Pro Val Leu Gly			
20	25	30	35
gctgcaacccggccggatccgttgcgcctgc ttc tcc gga gac gat ctg	319		
Ala Ala Asn Pro Ala Arg Asp Ala Ala Leu Phe Ser Gly Asp Asp Leu			
40	45	50	
aaacacgcccccccgccatgcgttgcgcctgc ttc tcc gga gac gat ctg	367		
Lys His Ala His His Pro Pro Ala Pro Pro Ala Ala Gly Pro			
55	60	65	
cggatccgttgcgcctgc ttc tcc gga gac gat ctg	415		
Arg Leu Pro Ser Glu Glu Leu Val Gln Thr Arg Cys Glu Met Glu Lys			
70	75	80	
tatctgaccctcagatccatgttgcgttgcgcctgc ttc tcc gga gat cat aaa	463		
Tyr Leu Thr Pro Gln Leu Pro Pro Val Pro Ile Ile Ser Glu His Lys			
85	90	95	
aaggataga cggatccatgttgcgttgcgcctgc ttc tcc gga gat cat aaa	511		

Lys Tyr Arg Arg Asp Ser Ala Ser Val Val Asp Gln Phe Phe Thr Asp

100 105 110 115

act gaa ggc ata cct tac agc atc aac atg aac gtc ttc ctc cct gac 559

Thr Glu Gly Ile Pro Tyr Ser Ile Asn Met Asn Val Phe Leu Pro Asp

120. 125 130

atc act cac ctg aga act ggc ctc tac aaa tcc cag aga cca tgc gta 607

Ile Thr His Leu Arg Thr Gly Leu Tyr Lys Ser Gln Arg Pro Cys Val

135 140 145

aca cag atc aag aca gaa cct gtt acc att ttc agc cac cag agc gag 655

Thr Gln Ile Lys Thr Glu Pro Val Thr Ile Phe Ser His Gln Ser Glu

150 155 160

tcg acg gcc cct cct cct cct ccg gcc ccc acc cag gct ctc ccc gag 703

Ser Thr Ala Pro Pro Pro Pro Ala Pro Thr Gln Ala Leu Pro Glu

165 170 175

ttc act agt atc ttc agc tcc cac cag acc aca gcg cca cca cag gag 751

Phe Thr Ser Ile Phe Ser Ser His Gln Thr Thr Ala Pro Pro Gln Glu

180 185 190 195

gtg aac aat atc ttc atc aaa caa gaa ctt cct ata cca gat ctt cat 799

Val Asn Asn Ile Phe Ile Lys Gln Glu Leu Pro Ile Pro Asp Leu His

200 205 210

ctc tct gtc cct tcc cag cag ggc cac ctg tac cag ctg ttg aat aca 847

Leu Ser Val Pro Ser Gln Gln Gly His Leu Tyr Gln Leu Leu Asn Thr

215	220	225	
ccg gat cta gac atg ccc agt tcg aca aac cag acg gca gta atg gac			895
Pro Asp Leu Asp Met Pro Ser Ser Thr Asn Gln Thr Ala Val Met Asp			
230	235	240	
acc ctt aat gtt tct atg gca ggc ctt aac cca cac ccc tct gct gtt			943
Thr Leu Asn Val Ser Met Ala Gly Leu Asn Pro His Pro Ser Ala Val			
245	250	255	
cca cag acg tca atg aaa cag ttc cag ggc atg ccc cct tgc acg tac			991
Pro Gln Thr Ser Met Lys Gln Phe Gln Gly Met Pro Pro Cys Thr Tyr			
260	265	270	275
acc atg cca agt cag ttt ctt cca cag cag gcc act tat ttt ccc ccg			1039
Thr Met Pro Ser Gln Phe Leu Pro Gln Gln Ala Thr Tyr Phe Pro Pro			
280	285	290	
tca cca cca agc tca gag cct gga agt ccc gat aga caa gct gag atg			1087
Ser Pro Pro Ser Ser Glu Pro Gly Ser Pro Asp Arg Gln Ala Glu Met			
295	300	305	
ctg cag aat ctc acc cca cct ccg tcc tat gcc gct aca att gct tcc			1135
Leu Gln Asn Leu Thr Pro Pro Ser Tyr Ala Ala Thr Ile Ala Ser			
310	315	320	
aaa ctg gcg att cac aac cca aat tta cct gcc act ctg cca gtt aat			1183
Lys Leu Ala Ile His Asn Pro Asn Leu Pro Ala Thr Leu Pro Val Asn			
325	330	335	

tcg cca act ctc cca cct gtc aga tac aac aga agg agt aac ccg gat	1231		
Ser Pro Thr Leu Pro Pro Val Arg Tyr Asn Arg Arg Ser Asn Pro Asp			
340	345	350	355
ctg gag aag cga cgt atc cac ttc tgc gat tat aat ggt tgc aca aaa	1279		
Leu Glu Lys Arg Arg Ile His Phe Cys Asp Tyr Asn Gly Cys Thr Lys			
360	365	370	
gtt tat aca aag tcg tct cac tta aaa gct cac ctg agg act cat acg	1327		
Val Tyr Thr Lys Ser Ser His Leu Lys Ala His Leu Arg Thr His Thr			
375	380	385	
ggc gag aag ccc tac aag tgc acc tgg gag ggc tgc gac tgg agg ttt	1375		
Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Thr Trp Glu Gly Cys Asp Trp Arg Phe			
390	395	400	
gcc cgg tcg gat gag ctg acc cgc cac tac agg aag cac acg ggc gcc	1423		
Ala Arg Ser Asp Glu Leu Thr Arg His Tyr Arg Lys His Thr Gly Ala			
405	410	415	
aag ccg ttc cag tgc atg gtg tgc caa cgc agc ttc tcc cgc tcc gac	1471		
Lys Pro Phe Gln Cys Met Val Cys Gln Arg Ser Phe Ser Arg Ser Asp			
420	425	430	435
cac ctc gcg ctg cac atg aag cgc cac cag aac tga gcgagcgaac	1517		
His Leu Ala Leu His Met Lys Arg His Gln Asn			
440	445		

gctgcgcccc cccgcctgac gccttgcagt ccgcattgcc atcccttaaa ccgcagacct 1577

aacttcataa aaag 1591

<210> 50

<211> 3359

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (312)..(1685)

<400> 51

ggtaacgtgcg ctgcgggttc tctcgccggag gtcggcggtg gcgggagcgg gctccggaga 60

gcctgagagc acgggtggggc ggggcgggag aaagtggccg cccggaggac gttggcggtt 120

acgtgtggaa gagcggaaaga gttttgcctt tcgtgcgcgc cttcgaaaac tgcctgcccgc 180

tgtctgagga gtccacccga aacctccct cctccgcccgg cagccccgcg ctgagctcgc 240

cgacccaagc cagcgtgggc gaggtggaa gtgcgcgcga cccgcgcctg gagctgcgc 300

cccgagtgcc c atg gct aca agg gtg ctg agc atg agc gcc cgc ctg gga 350

Met Ala Thr Arg Val Leu Ser Met Ser Ala Arg Leu Gly

1

5

10

ccc	gtg	ccc	cag	ccg	ccg	gcg	ccg	cag	gac	gag	ccg	gtg	ttc	gcg	cag	398
Pro	Val	Pro	Gln	Pro	Pro	Ala	Pro	Gln	Asp	Glu	Pro	Val	Phe	Ala	Gln	
15		20							25							
ctc	aag	ccg	gtg	ctg	ggc	gcc	gcg	aat	ccg	gcc	cgc	gac	gcg	gcg	ctc	446
Leu	Lys	Pro	Val	Leu	Gly	Ala	Ala	Asn	Pro	Ala	Arg	Asp	Ala	Ala	Leu	
30		35							40				45			
ttc	ccc	ggc	gag	gag	ctg	aag	cac	gcg	cac	cac	cgc	ccg	cag	gcg	cag	494
Phe	Pro	Gly	Glu	Glu	Leu	Lys	His	Ala	His	His	Arg	Asp	Ala	Gln		
	50								55				60			
ccc	gcg	ccc	gcg	cag	gcc	ccg	ccg	cag	ccg	ccc	gcc	acc	ggc		542	
Pro	Ala	Pro	Ala	Gln	Ala	Pro	Gln	Pro	Ala	Gln	Pro	Pro	Ala	Thr	Gly	
	65								70				75			
ccg	cgg	ctg	cct	cca	gag	gac	ctg	gtc	cag	aca	aga	tgt	gaa	atg	gag	590
Pro	Arg	Leu	Pro	Pro	Glu	Asp	Leu	Val	Gln	Thr	Arg	Cys	Glu	Met	Glu	
	80								85				90			
aag	tat	ctg	aca	cct	cag	ctt	cct	cca	gtt	cct	ata	att	cca	gag	cat	638
Lys	Tyr	Leu	Thr	Pro	Gln	Leu	Pro	Pro	Val	Pro	Ile	Ile	Pro	Glu	His	
	95								100				105			
aaa	aag	tat	aga	cga	gac	agt	gcc	tca	gtc	gta	gac	cag	ttc	ttc	act	686
Lys	Lys	Tyr	Arg	Arg	Asp	Ser	Ala	Ser	Val	Val	Asp	Gln	Phe	Phe	Thr	
	110								115				120		125	
gac	act	gaa	ggg	tta	cct	tac	agt	atc	aac	atg	aac	gtc	ttc	ctc	cct	734

Asp Thr Glu Gly Leu Pro Tyr Ser Ile Asn Met Asn Val Phe Leu Pro

130 135 140

gac atc act cac ctg aga act ggc ctc tac aaa tcc cag aga ccg tgc 782

Asp Ile Thr His Leu Arg Thr Gly Leu Tyr Lys Ser Gln Arg Pro Cys

145 150 155

gta aca cac atc aag aca gaa cct gtt gcc att ttc agc cac cag agt 830

Val Thr His Ile Lys Thr Glu Pro Val Ala Ile Phe Ser His Gln Ser

160 165 170

gaa acg act gcc cct cct ccg gcc ccg acc cag gcc ctc cct gag ttc 878

Glu Thr Thr Ala Pro Pro Ala Pro Thr Gln Ala Leu Pro Glu Phe

175 180 185

acc agt ata ttc agc tca cac cag acc gca gct cca gag gtg aac aat 926

Thr Ser Ile Phe Ser Ser His Gln Thr Ala Ala Pro Glu Val Asn Asn

190 195 200 205

att ttc atc aaa caa gaa ctt cct aca cca gat ctt cat ctt tct gtc 974

Ile Phe Ile Lys Gln Glu Leu Pro Thr Pro Asp Leu His Leu Ser Val

210 215 220

cct acc cag cag ggc cac ctg tac cag cta ctg aat aca ccg gat cta 1022

Pro Thr Gln Gln Gly His Leu Tyr Gln Leu Leu Asn Thr Pro Asp Leu

225 230 235

gat atg ccc agt tct aca aat cag aca gca gca atg gac act ctt aat 1070

Asp Met Pro Ser Ser Thr Asn Gln Thr Ala Ala Met Asp Thr Leu Asn

240

245

250

gtt tct atg tca gct gcc atg gca ggc ctt aac aca cac acc tct gct 1118
 Val Ser Met Ser Ala Ala Met Ala Gly Leu Asn Thr His Thr Ser Ala

255

260

265

gtt ccg cag act gca gtg aaa caa ttc cag ggc atg ccc cct tgc aca 1166
 Val Pro Gln Thr Ala Val Lys Gln Phe Gln Gly Met Pro Pro Cys Thr
 270 275 280 285

tac aca atg cca agt cag ttt ctt cca caa cag gcc act tac ttt ccc 1214
 Tyr Thr Met Pro Ser Gln Phe Leu Pro Gln Gln Ala Thr Tyr Phe Pro
 290 295 300

ccg tca cca cca agc tca gag cct gga agt cca gat aga caa gca gag 1262
 Pro Ser Pro Pro Ser Ser Glu Pro Gly Ser Pro Asp Arg Gln Ala Glu
 305 310 315

atg ctc cag aat tta acc cca cct cca tcc tat gct gct aca att gct 1310
 Met Leu Gln Asn Leu Thr Pro Pro Ser Tyr Ala Ala Thr Ile Ala
 320 325 330

tct aaa ctg gca att cac aat cca aat tta ccc acc acc ctg cca gtt 1358
 Ser Lys Leu Ala Ile His Asn Pro Asn Leu Pro Thr Thr Leu Pro Val
 335 340 345

aac tca caa aac atc cca cct gtc aga tac aat aga agg agt aac ccc 1406
 Asn Ser Gln Asn Ile Gln Pro Val Arg Tyr Asn Arg Arg Ser Asn Pro
 350 355 360 365

gat ttg gag aaa cga cgc atc cac tac tgc gat tac cct ggt tgc aca	1454		
Asp Leu Glu Lys Arg Arg Ile His Tyr Cys Asp Tyr Pro Gly Cys Thr			
370	375	380	
aaa gtt tat acc aag tct tct cat tta aaa gct cac ctg agg act cac	1502		
Lys Val Tyr Thr Lys Ser Ser His Leu Lys Ala His Leu Arg Thr His			
385	390	395	
act ggt gaa aag cca tac aag tgt acc tgg gaa ggc tgc gac tgg agg	1550		
Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Thr Trp Glu Gly Cys Asp Trp Arg			
400	405	410	
ttc gcg cga tcg gat gag ctg acc cgc cac tac cgg aag cac aca ggc	1598		
Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Thr Arg His Tyr Arg Lys His Thr Gly			
415	420	425	
gcc aag ccc ttc cag tgc ggg gtg tgc aac cgc agc ttc tcg cgc tct	1646		
Ala Lys Pro Phe Gln Cys Gly Val Cys Asn Arg Ser Phe Ser Arg Ser			
430	435	440	445
gac cac ctg gcc ctg cat atg aag agg cac cag aac tga gcactgccccg	1695		
Asp His Leu Ala Leu His Met Lys Arg His Gln Asn			
450	455		
tgtgaccgt tccaggtccc ctgggctccc tcaaatgaca gacctaacta ttccctgtgta	1755		
aaaacaacaa aaacaaaaaa aaaacaagaa aaccacaact aaaactggaa atgtatattt	1815		

tgtatattt agaaaacagg gaatacattt tattaatacc aaagtgtttt gtcattttaa 1875
aatctggaa tgcttgctgt aatgtatatg gctttactca agcagatctc atctcatctc 1935
atgacaggca gccagtctca acatggtaa ggggtggggg tgaaggggag tgtgtgcagc 1995
gttttacctt aggaccatc attaatgtt acagtgttca gtaaacaat cagttggcag 2055
gcaccagaag aagaatggat tgtatgtcaa gattttactt ggcattgagt agttttttc 2115
aatagtaggt aattccttag agatacagta tacctggcaa ttcacaaata gccattgaac 2175
aaatgtgtgg gtttttaaaa attatataca tatatgagtt gcctatattt gctattcaaa 2235
attttgtaaa tatgcaaatc agctttatag gtttattaca agtttttag gattttttt 2295
ggaaagagtc ataattcttt tgaaaataac catgaataca cttacagttt ggatttgg 2355
taaggtacctt ctcaacatta ccaaaatcat ttcttagag ggaaggaata atcattcaaa 2415
tgaactttaa aaaagcaaataat ttcatgcact gattaaaata ggattttttt aaataaaaa 2475
ggcattttat atgaattata aactgaagag cttaaagata gttacaaaat acaaaagttc 2535
aacctttac aataagctaa acgcaatgtc atttttaaaa agaaggactt aggggtcggtt 2595
ttcacatatg acaatgttgc atttatgatg cagtttcaa gtacaaaaac gttgaattga 2655
tgatgcagtt ttcatatatc gagatgttgc ctcgtgcagt actgttggtt aaatgacaat 2715

ttatgtggat tttgcgtat atacacagtg agacacagta attttatcta aattacagtg 2775
 cagtttagtt aatctattaa tactgactca gtgtctgcct ttaaatataa atgatatgtt 2835
 gaaaacttaa ggaagcaaat gctacatata tgcaatataa aatagtaatg tgatgctgat 2895
 gctgttaacc aaagggcaga ataaataagc aaaatgcca aaggggtctt aattgaaatg 2955
 aaaatataat tttgtttta aaatattgtt tatcttatt tattttgtgg taatatagt 3015
 agttttttta gaagacaatt ttcataactt gataaattat agttttgtt gttagaaaag 3075
 ttgctcttaa aagatgtaaa tagatgacaa acgatgtaaa taattttgtta agaggctca 3135
 aaatgtttat acgtggaaac acacctacat gaaaagcaga aatcggtgc tgtttgctt 3195
 cttttccct cttattttg tattgtggtc attcctatg caaataatgg agcaaacagc 3255
 tgtatagttg tagaattttt tgagagaatg agatgtttat atattaacga caatttttt 3315
 tttggaaaat aaaaagtgcc taaaagaaaa aaaaaaaaaa aaaa 3359

【図面の簡単な説明】

【図1】 KLF5遺伝子特異的なsiRNAによるKLF5遺伝子の発現抑制を示す。左から、100bpマーカー、siRNAを導入しなかった細胞、SEAP-siRNA、siRNA No. 2、siRNA No. 3、siRNA No. 4、siRNA No. 5、siRNA No. 6をそれぞれ導入した細胞でのPCRによる測定で、KLF5は、KLF5 mRNA由来の増幅産物、18Sは、18S rRNA

由来の増幅産物の位置を示す。

【図2】 KLF5遺伝子特異的なsiRNAによるKLF5遺伝子の発現抑制を示す。左から、100bpマーカー、siRNAを導入しなかった細胞、SEAP-siRNA、siRNA No. 7、siRNA No. 8、siRNA No. 9、siRNA No. 10、siRNA No. 11、siRNA No. 4、siRNA No. 1をそれぞれ導入した細胞でのPCRによる測定で、KLF5は、KLF5 mRNA由来の増幅産物、18Sは、18S rRNA由来の増幅産物の位置を示す。

【図3】 KLF5遺伝子特異的なsiRNAによるPDGF-A遺伝子の発現抑制を示す。左から、100bpマーカー、siRNAを導入しなかった細胞、SEAP-siRNA、siRNA No. 7、siRNA No. 8、siRNA No. 9、siRNA No. 10、siRNA No. 11、siRNA No. 4、siRNA No. 1をそれぞれ導入した細胞でのPCRによる測定で、PDGF-Aは、PDGF-A mRNA由来の増幅産物、18Sは、18S rRNA由来の増幅産物の位置を示す。

【図4】 KLF5遺伝子特異的なsiRNAによるSMemb遺伝子の発現抑制を示す。左から、100bpマーカー、siRNAを導入しなかった細胞、SEAP-siRNA、siRNA No. 7、siRNA No. 8、siRNA No. 9、siRNA No. 10、siRNA No. 11、siRNA No. 4、siRNA No. 1をそれぞれ導入した細胞でのPCRによる測定で、SMembは、SMemb mRNA由来の増幅産物、18Sは、18S rRNA由来の増幅産物の位置を示す。

【図5】 KLF5遺伝子特異的なsiRNAはSRF遺伝子の発現は抑制しないことを示す。左から、siRNAを導入しなかった細胞、SEAP-siRNA、siRNA No. 1、siRNA No. 4、siRNA No. 7、siRNA No. 9、siRNA No. 10をそれぞれ導入した細胞でのPCRによる測定で、SRFは、SRF mRNA由来の増幅産物、18Sは、18S rRNA由来の増幅産物の位置を示す。

【書類名】 図面

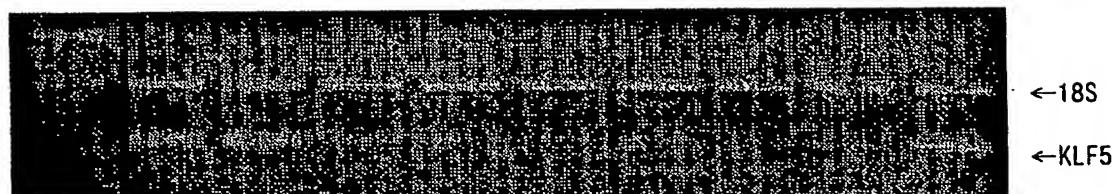
【図 1】

100bp siRNA SEAP- siRNA siRNA siRNA siRNA siRNA
マーカー なし siRNA No. 2 No. 3 No. 4 No. 5 No. 6



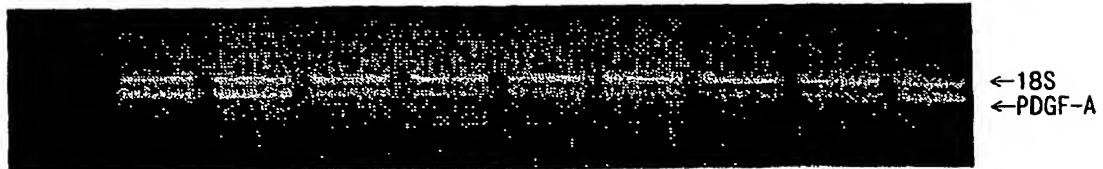
【図 2】

100bp siRNA SEAP- siRNA siRNA siRNA siRNA siRNA siRNA
マーカー なし siRNA No. 7 No. 8 No. 9 No. 10 No. 11 No. 4 No. 1



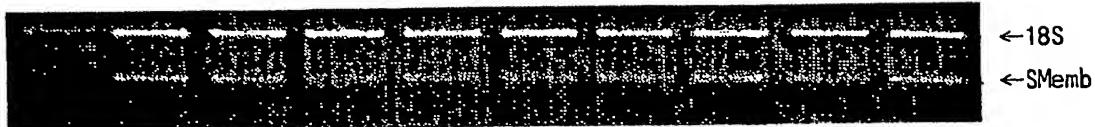
【図 3】

100bp siRNA SEAP- siRNA siRNA siRNA siRNA siRNA siRNA
マーカー なし siRNA No. 7 No. 8 No. 9 No. 10 No. 11 No. 4 No. 1



【図4】

100bp siRNA SEAP- siRNA siRNA siRNA siRNA siRNA siRNA
マーカー なし siRNA No. 7 No. 8 No. 9 No. 10 No. 11 No. 4 No. 1



【図5】

siRNA siRNA siRNA siRNA siRNA siRNA SEAP-
なし No. 1 No. 4 No. 7 No. 9 No. 10 siRNA



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 クルッペル様因子5 (KLF5) 遺伝子の発現を抑制するRNAを提供すること。

【解決手段】 KLF5 cDNAの塩基配列から設計した、配列番号2～16のいずれか1つの塩基配列および該塩基配列と相補的な塩基配列のそれぞれの3'端に2個のウリジル酸を付加した塩基配列からなる二本鎖RNA。該RNAまたは該RNAを発現するベクターを細胞に導入することにより、該細胞中のKLF5遺伝子の発現を抑制することができる。該RNAまたは該RNAを発現するベクターは、心血管系疾患または癌の治療薬に用いることができる。

【選択図】 なし

特願2003-202863

出願人履歴情報

識別番号

[594053419]

1. 変更年月日

1994年 3月 3日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都文京区湯島4丁目8番3号 日商岩井第二本郷マンショ
ン609

氏 名

永井 良三

2. 変更年月日

2003年10月10日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都文京区本郷2-32-2-1204

氏 名

永井 良三

特願 2003-202863

出願人履歴情報

識別番号

[000001029]

1. 変更年月日

1990年 8月 6日

[変更理由]

新規登録

住所

東京都千代田区大手町1丁目6番1号

氏名

協和醸酵工業株式会社

特願 2003-202863

出願人履歴情報

識別番号

[503271899]

1. 変更年月日

2003年 7月29日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都台東区池之端 4-15-8-202

氏 名

眞鍋 一郎

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.